

氏 名	あさひな こうた 朝比奈 幸太
学 位 の 種 類	博士（薬学）
学 位 記 番 号	富医薬博甲第 154 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 4 日
学位授与の要件	富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当
教 育 部 名	富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程 生命薬科学専攻
学位論文題目	ABC タンパク質サブファミリーD のオルガネラ選択的局在化機構の解析
論文審査委員	
（主査）	教 授 櫻井 宏明（指導教員）
（副査）	准教授 田 渕 明子
（副査）	教 授 今 中 常雄

論文内容の要旨

ATP-binding cassette (ABC) タンパク質は、生体膜を介した多様な物質輸送に重要な役割を担っている。ヒトにおいては 48 種類の ABC タンパク質が同定され、A~G の 7 群のサブファミリーに分類されている。サブファミリー D には ABCD1/ALDP、ABCD2/ALDRP、ABCD3/PMP70、ABCD4/P70R の 4 種類が同定されている。ABCD タンパク質は当初、すべてペルオキシソーム膜に局在すると考えられていたが、当研究室では ABCD4 が小胞体に局在化することを見出してきた。アミノ酸配列の相同性の高い ABCD タンパク質がペルオキシソームもしくは小胞体にどのような機序で選択的に局在化するかは興味深い。

細胞膜やリソソームの膜タンパク質は、翻訳中に出現した膜貫通領域 (TMD) などの疎水性アミノ酸配列がシグナル認識粒子 (SRP) に結合し、小胞体膜上にリクルートされ小胞体膜に挿入される。その後、小胞輸送により各オルガネラ膜へと輸送される。一方、ペルオキシソーム膜タンパク質は、細胞質中に存在する遊離型ポリソームで生合成された後、post-translational に直接ペルオキシソームへと輸送される。また細胞質に存在するペルオキシソーム形成因子 Pex19p がペルオキシソーム膜形成に必須であることより、ペルオキシソーム膜タンパク質の局在化過程で何らかの役割を果たしていることが推定されている。しかしながら、ペルオキシソーム膜タンパク質のペルオキシソーム膜局在化機構の詳細は不明である。

そこで本研究では、まずペルオキシソーム膜の主要構成タンパク質である ABCD3 のペルオキシソーム膜局在化機構を解析し、ペルオキシソーム膜局在化に必要な領域を見出した。さらに ABCD3 のペルオキシソーム膜局在化において、Pex19p は ABCD3 の特定の領域と相互作用することにより可溶性の複合体を形成し、シャペロン様作用を有することを見出した。また当研究室では ABCD4 は N 末端の疎水性領域を欠くことにより小胞体に局在化することを明らかにしてきた。そこで、ABC タンパク質サブファミリー D において、N 末端疎水性領域の有無によるオルガネラ選択的局在化機構が生物種を超えて保存されている可能性を提示した。

第 1 部 ヒト ABCD3 のペルオキシソーム膜局在化における疎水性領域の同定¹⁾

ヒト ABCD3 は 659 アミノ酸からなり、N 末端側に 6 つの TMD と、それに続く細胞質側に露出したヌクレオチド結合領域 (NBD) を有する。ABCD3 を含むペルオキシソーム膜タンパク質の共通なペルオキシソーム膜局在化シグナルや、ペルオキシソーム膜局在化における Pex19p の役割は明らかとなっていない。そこで、まず ABCD3 のペルオキシソーム膜局在化に重要な領域を同定するため、ABCD3 の各種欠損変異体に green fluorescent protein (GFP) を融合させたタンパク質を CHO 細胞に発現させ、その細胞内局在を蛍光顕微鏡により観察した。

ABCD3 の C 末端側から TMD3 までを欠損させ TMD1 および 2 を残し、C 末端側に GFP を融合させた欠損変異体 ABCD3(AA.1-144)-GFP はペルオキシソームに局在した。また、N 末端側に GFP を融合させた欠損変異体 GFP-ABCD3(AA.1-144)でも同様の結果が得られた。さらに、TMD2 を欠損させた ABCD3(AA.1-124)-GFP はペルオキシソーム局在性を失った。ただ、ABCD3(AA.1-144)-GFP の TMD2 の代わりに TMD4 もしくは TMD6 に置換した変異体はペルオキシソームに局在した。一方、N 末端側から 61 アミノ酸を欠損させた ABCD3(AA.62-659)-GFP は、すべての TMD を含みながらもペルオキシソーム局在性

を失った。さらにABCD3(AA.1-144)-GFPならびに全長ABCD3(AA.1-659)-GFPにおいて、N末端側に存在する2つの疎水性アミノ酸領域(L21-L22-L23およびI70-L71)をそれぞれ親水性アミノ酸に置換すると、ペルオキシソーム局在性が消失した。また、さらなるN末端側からの欠損変異体の解析から、N末端側からTMD4までを欠損させたGFP-ABCD3(AA.263-375)はペルオキシソーム膜に局在化し、TMD5に隣接したI307-L308を親水性アミノ酸に置換すると、ペルオキシソーム局在性が消失した。これらのことから、ABCD3のペルオキシソーム膜局在化には、①N末端側の疎水性アミノ酸領域(L21-L22-L23およびI70-L71)とそれに続く少なくとも2つ以上のTMDと②I307-L308を含むTMD5-6の領域がペルオキシソーム膜局在化に重要な役割を担っていることを明らかにした。

第2部 ヒトABCD3のペルオキシソーム局在化におけるPex19pの役割²⁾

Pex19pはペルオキシソーム膜形成に必須の細胞質タンパク質である。Pex19pは多くのペルオキシソーム膜タンパク質と相互作用することから、ペルオキシソーム膜タンパク質の細胞質受容体もしくは生合成されたペルオキシソーム膜タンパク質を安定化させるシャペロンとして働く可能性が考えられている。そこで、小麦胚芽抽出液を用いた*in vitro*発現系を用い、大腸菌により発現・精製したHis-Pex19p存在下ならびに非存在下でABCD3を生合成させた。するとABCD3は、His-Pex19p非存在下では凝集体を形成したが、存在下ではABCD3の約75%が可溶性分画に回収され、抗His抗体を用いた免疫沈降によりPex19pと複合体を形成していることが示された。またHis-Pex19pとABCD3との結合は選択性があり、ミトコンドリアに局在するABCB10/ABC-meとは結合しなかった。さらにABCD3とPex19pとの結合領域を解析するため、ABCD3のN末端側ならびにC末端側から欠損させた各種変異体をPex19p存在下で生合成させ、免疫沈降実験を行った、その結果、ABCD3とHis-Pex19pとの結合は、ABCD3のN末端側から61アミノ酸を欠損させたABCD3(AA.62-659)ならびにC末端側からTMD6までを欠損させたPMP(AA.1-321)では結合性が顕著に低下した。第1部の解析結果から、N末端側に存在する疎水性アミノ酸領域(L21-L22-L23およびI70-L71)ならびにTMD5に隣接したI307-L308がABCD3のペルオキシソーム膜局在化に重要であることより、各種部位特異的な変異体(L21Q/L22Q/L23Q, I70N/L71Q, I307N/L308Q)に関して同様に免疫沈降実験を行うと、L21-L22-L23を置換した変異体はABCD3全長と比べHis-Pex19pとの結合効率が顕著に低下したが、I70-L71、I307-L308を置換した変異体では結合効率が低下しなかった。以上のことから、Pex19pはABCD3と複合体を形成し、ABCD3を可溶性に保つこと、ABCD3のN末端領域に存在するL21-L22-L23とTMD5、6付近の領域と相互作用することが示唆された。

第3部 ABCDタンパク質におけるオルガネラ選択的局在化機構の種を超えた共通性³⁾

私の所属する研究室では、私の見出したABCD3のN末端に存在するペルオキシソーム局在化に必要なL21-L22-L23を含む疎水性領域(H0モチーフ)が、ヒトならびにマウスABCD1~3に存在すること、ABCD4はこの領域を欠くことでPex19pと相互作用せず、SRPと結合し小胞体に局在化することを明らかにしている。さらに、ABCD3のH0モチーフを含むN末端80アミノ酸のみではミトコンドリア外膜に局在化し、それに続くTMD1-2が存在することでペルオキシソーム局在する結果を得ている。よって我々は、N末端に存在するH0モチーフはABCDタンパク質の小胞体局在化を抑制するために必須

であり、TMD1-2 と協調してペルオキシソーム膜に局在化することを提唱している。そこで、この法則が種を超えて存在することを検証した。

ほとんどすべての真核生物は、ヒト ABCD タンパク質ホモログを有し、いくつかの種において ABCD タンパク質には H0 モチーフの有無が存在する。そこでまず、今まで知られている真核生物の ABCD タンパク質に関して疎水性プロット解析を実施した。その結果、解析した 143 種の生物のうち、少なくとも 60 種の生物が N 末端に H0 モチーフを欠く ABCD タンパク質を有していることを明らかにした。次に Metasoa、Plant、Fungi より H0 モチーフの有無をもつ *Caenorhabditis elegans*、*Arabidopsis thaliana*、*Mucor circinelloides* を選択し、各 ABCD タンパク質を GFP と融合として一過的に CHO 細胞に発現させ、その細胞内局在性を蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、どの生物種においても、H0 モチーフを有する ABCD タンパク質はペルオキシソームに局在し、H0 モチーフを有さない ABCD タンパク質は小胞体もしくはペルオキシソーム以外のオルガネラに局在した。また、*C. elegans* の pmp-1, 2 および 4 の H0 モチーフを欠損させた欠損変異体は、ペルオキシソームへの局在化能を失い、小胞体に局在することを明らかにした。さらに、H0 モチーフを持たない pmp-5 の N 末端に pmp-2 の H0 モチーフを含む N 末端 64 アミノ酸を結合させたキメラタンパク質の細胞内分布は、小胞体ではなくミトコンドリアと一致した。すなわち、キメラタンパク質は H0 モチーフにより小胞体局在化機構から逃れるが、ペルオキシソーム局在化に必要な領域をもたないためにミトコンドリアに局在したと考えられた。以上のことより、ABCD タンパク質の細胞内局在における H0 モチーフの役割が、種を超えて保存されていることを明らかにした。

総括

本研究により、ABCD3 が Pex19p と複合体を形成し、ペルオキシソーム膜へ局在化する詳細なメカニズムを提唱した。さらに、ABCD タンパク質のオルガネラ選択的局在化機構が N 末端に存在する疎水性に富んだ H0 モチーフに強く依存すること、またそのメカニズムが生物種を超えて存在することを見出し、進化の過程で保存されている可能性を示した。

参考文献

- 1) Kashiwayama, Y., Asahina, K., Morita, M., and Imanaka, T.: Hydrophobic regions adjacent to transmembrane domains 1 and 5 are important for the targeting of the 70-kDa peroxisomal membrane protein. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 33831-33844.
- 2) Kashiwayama, Y., Asahina, K., Shibata, H., Morita, M., Muntau, A. C., Roscher, A. A., Wanders, R. J. A., Shimozaawa, N., Kato, H., and Imanaka, T.: Role of Pex19p in the targeting of PMP70 to peroxisomes. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* 1746, 116-128.
- 3) Lee, A., Asahina, K., Okamoto, T., Kawaguchi, K., Kostsin, D. G., Kashiwayama, Y., Takanashi, K., Yazaki, K., Imanaka, T., and Morita, M.: Role of NH₂-terminal hydrophobic motif in the subcellular localization of ATP-binding cassette protein subfamily D: Common features in eukaryotic organisms. (2014) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453, 612-618.

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

ATP-binding cassette (ABC) タンパク質は、生体膜を介した多様な物質の輸送に関与している。ヒトでは 48 種類の ABC タンパク質が同定され、A～G の 7 群のサブファミリーに分類されている。サブファミリー D については、ABCD1-4 の 4 種が同定され、ABCD1-3 はペルオキシソームへ、ABCD4 は小胞体へ局在化するが、その機序は解明されていない。学位申請者の朝比奈幸太氏は、ペルオキシソーム膜の主要構成タンパク質である ABCD3 に着目し、ABCD3 の N 末端の疎水性領域 (H0) が局在化に必要であることを見出した。さらに ABCD3 のペルオキシソーム膜局在化において、Pex19p は生合成された ABCD3 を可溶性に保つシャペロン様作用を有することを見出した。一方 ABCD4 は、ABCD3 のもつ H0 モチーフを欠くことにより小胞体に局在化する。H0 モチーフの有無によるオルガネラ選択的局在化機構が、生物種を超えて保存されていることを明らかにした。本学位論文の内容と審査結果は以下の通りである。

1. ヒト ABCD3 のペルオキシソーム膜局在化に関わる疎水性領域の同定

ABCD3 のペルオキシソーム膜局在化に関わる領域を同定するため、ABCD3 の各種欠損変異体に green fluorescent protein (GFP) を融合させたタンパク質を CHO 細胞に発現させ、その細胞内局在を解析した。その結果、N 末端の H0 モチーフと transmembrane domain (TMD)1, 2 を含む領域と TMD5,6 の領域がペルオキシソーム膜局在化に重要であることを見出した。さらに全長 ABCD3-GFP において、H0 モチーフの 2 つの疎水性アミノ酸領域 (L21-L22-L23 および I70-L71) もしくは TMD5 に隣接した I307-L308 を親水性アミノ酸に置換すると、ペルオキシソーム局在性が消失した。以上より、ABCD3 のペルオキシソーム膜局在化には、①N 末端側の疎水性アミノ酸領域 (L21-L22-L23 および I70-L71) とそれに続く少なくとも 2 つ以上の TMD と②I307-L308 を含む TMD5-6 の領域が重要な役割を担っていることを示した。

2. ヒト ABCD3 のペルオキシソーム局在化における Pex19p の役割

Pex19p はペルオキシソーム膜形成に必須の細胞質タンパク質であり、多くのペルオキシソーム膜タンパク質と相互作用する。そこで、生合成された ABCD3 を安定化させるシャペロンとして働く可能性を検証した。In vitro 発現系で ABCD3 を生合成させると、ABCD3 は His-Pex19p 非存在下では凝集体を形成したが、存在下では ABCD3 の約 75% が可溶性分画に回収され、Pex19p と複合体を形成していた。また His-Pex19p と ABCD3 との結合は選択性があり、ミトコンドリアに局在する ABCB10 とは結合しなかった。さらに ABCD3 と Pex19p との結合領域を解析し、Pex19p と ABCD3 の相互作用には、ABCD3 の N 末端側に存在する疎水性アミノ (L21-L22-L23) を含む領域 (H0 モチーフ) ならびに TMD 5, 6 付近の領域が重要であることを明らかにした。以上より、生合成された ABCD3 が Pex19p と結合することにより可溶性を維持し、I307-L308 と I70-L71 を介してペルオキシソーム膜に局在化するモデルを示した。

3. ABCD タンパク質におけるオルガネラ選択的局在化機構の種を超えた共通性

ABCD3 の N 末端に存在する H0 モチーフは、ABCD1-3 に存在する。一方、ABCD4 はこの領域を欠くことで Pex19p と相互作用せず小胞体に局在化する。そこで、この法則が種を超えて存在することを検証した。多くの真核生物はヒト ABCD タンパク質ホモログを有し、いくつかの種で H0 モチーフの有無が存在する。ABCD タンパク質の疎水性プロット解析を実施

し、143 種の生物のうち少なくとも 60 種の生物が N 末端に H0 モチーフを欠く ABCD タンパク質を有していることを明らかにした。そこで、Metazoa、Plant、Fungi より *C. elegans*、*A. thaliana*、*M. circinelloides* を選択し、各 ABCD-GFP を CHO 細胞に発現させ、その細胞内局在性を解析した。その結果、どの生物種においても、H0 モチーフを有する ABCD タンパク質はペルオキシソームに局在し、H0 モチーフを欠く ABCD タンパク質は小胞体もしくはペルオキシソーム以外のオルガネラに局在した。このことより、ABCD タンパク質の細胞内局在における H0 モチーフの役割が種を超えて保存されている可能性を提唱した。

以上のように申請者は、ABC タンパク質サブファミリーD のオルガネラ選択的局在化機構を解析し、ABCD3 が Pex19p と複合体を形成しペルオキシソーム膜へ局在化する詳細なメカニズムを提唱した。さらに、ABCD タンパク質のオルガネラ選択的局在化機構が N 末端に存在する疎水性に富んだ H0 モチーフに強く依存すること、またそのメカニズムが生物種を超えて存在することを提唱した。これらの研究は国際学術誌に掲載され、国内外で高く評価されている。主査および副査は、朝比奈幸太氏に口頭試問を行うとともに、論文内容について審査し、博士（薬学）を授与するに値すると判定した。

なお本研究は、今中常雄教授の指導のもと、分子細胞機能学研究室で行われたことを付記する。

- 1) Kashiwayama, Y., Asahina, K., Morita, M., and Imanaka, T.: Hydrophobic regions adjacent to transmembrane domains 1 and 5 are important for the targeting of the 70-kDa peroxisomal membrane protein. *J. Biol. Chem.* 282, 33831-33844 (2007).
- 2) Kashiwayama, Y., Asahina, K., Shibata, H., Morita, M., Muntau, A. C., Roscher, A. A., Wanders, R. J. A., Shimozawa, N., Kato, H., and Imanaka, T.: Role of Pex19p in the targeting of PMP70 to peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1746, 116-128 (2005).
- 3) Lee, A., Asahina, K., Okamoto, T., Kawaguchi, K., Kostsin, D. G., Kashiwayama, Y., Takanashi, K., Yazaki, K., Imanaka, T., and Morita, M.: Role of NH₂-terminal hydrophobic motif in the subcellular localization of ATP-binding cassette protein subfamily D: Common features in eukaryotic organisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453, 612-618 (2014).